

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2000 年 12 月 7 日 (07.12.2000)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 00/72824 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 9/127 (74) 代理人: 弁理士 大家邦久, 外(OHIE, Kunihisa et al.); 〒103-0013 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/03472
- (22) 国際出願日: 2000 年 5 月 30 日 (30.05.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願平11/153579 1999 年 6 月 1 日 (01.06.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 小野薬品工業株式会社 (ONO PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒541-8526 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 中西 親 (NAKANISHI, Chikashi) [JP/JP]; 〒244-0803 神奈川県横浜市戸塚区平戸町1087-17 Kanagawa (JP). 溪英敏 (TANI, Hidetoshi) [JP/JP]. 西浦昭雄 (NISHIURA, Akio) [JP/JP]; 〒618-8585 大阪府三島郡島本町桜井3丁目1番1号 小野薬品工業株式会社 水無瀬総合研究所内 Osaka (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MICROLIPOSONES AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 微小なリポソームおよびその製造方法

(57) Abstract: Microliposomes obtained by injecting liposome materials containing lipids into an aqueous sugar solution or a sugar slurry of a high concentration. These microliposomes can be easily and efficiently produced while minimizing the amount of organic solvents employed without resort to any severe physical treatments.

(57) 要約:

高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入することにより得られる微小なリポソーム、およびその製造方法に関する。

本発明によれば、有機溶媒の使用量を少量に抑えて、また過酷な物理的処理を行わずに、容易かつ効率的に微小なリポソームを製造することができる。

WO 00/72824 A1

## 明 細 書

## 微小なりポソームおよびその製造方法

## 5 技術分野

本発明は、糖類を用いて製造されるリポソームおよびその製造方法に関する。さらに詳しくは、高濃度の糖類を用いて製造される微小なりポソーム、およびその製造方法に関する。

## 10 背景技術

リポソームは、脂質の閉鎖小包体であり、その小包体内部に封入した薬物を体内の特定部位に意図的に指向させること、また薬物の安定性や放出の持続性の確保を目的として利用されている。

- その粒子径は、体内動態における重要な因子であり、例えば、血液循環系からの消失、各組織への分布、臓器による吸収、組織間の移行等に深く関わっている。これらをスムーズに行なわせるためには、微小な粒子が好ましい。また、粒子径を微小化させることにより注射剤に要求されるフィルター過滅菌が可能となる。このように注射製剤においては粒子径が重要な因子である。

- 20 従来のリポソームの製造方法は、リン脂質を水性分散媒中に水和・膨潤させる第1工程と、所望の粒子径を得るために微小化させる第2工程とからなるものが多く、それぞれの工程において種々の工夫がなされている。

- 例えば、第1工程としては、脂質を揮発性有機溶媒に溶解した溶液から溶媒を留去し、容器内壁に脂質などからなる薄膜を形成させ、水性分散媒を加え攪拌し、脂質の薄膜を水和および膨潤させる方法がある。この方法は比較的簡便ではあるが水和・膨潤後のリポソームは多層小包体であり、その粒子径はおおよそ数～数100ミクロンと比較的大きい。そこで、注射剤等の小さな粒子径まで微小化する必要がある場合、微小化の工程が必要となる。

第2工程となるリポソームの微小化や粒子径分布の均一化の方法としては、例えば、ポリカーボネートフィルターによるエクストルージョン、高圧乳化、超音波照射等がある（リポソーム（南江堂，1988 年）参照）。微小化前の水和されたりポソームの粒子径が大きい場合には、同じ口径のポリカーボネート  
5 トフィルターに、リポソーム分散液を繰り返し通過させたり（特許第2537186号（WO8600238、EP185756）明細書参照）、高圧での乳化や超音波照射時間の延長が必要となり、製造時間や製造装置の大型化が問題となる。

そこで、上記の方法より容易に微小なりポソームを製造する方法、または  
10 有機溶媒を使用しないで、微小なりポソームを製造する方法がいくつか提案されている。

例えば、よく知られた方法として、（1）界面活性剤除去法、有機溶媒注入法がある（リポソーム（南江堂，1988）、ライフサイエンスにおけるリポ  
15 ソーム実験マニュアル（シュプリンガー・フェアラー東京，1992）参照）。  
界面活性剤除去法は、脂質を界面活性剤によって可溶化した後、界面活性剤を除去することにより微小なりポソームを得る方法として知られている。しかし、この方法を用いて大量調製する場合には、界面活性剤を除去する装置が必要であり、またその処理時間が問題となる。

有機溶媒注入法は、脂質をエタノールなどの水溶性有機溶媒に溶解し、その  
20 の溶液を水性分散媒中に注入するものであり、水和が容易で、かつ微小なりポソームを製造する方法として知られている。この方法で得られるリポソームの粒子径は、脂質溶液の濃度に大きく依存しており、脂質溶液をより希薄にすることによって微小なりポソームが得られる。しかし、脂質溶液を希薄にすると、必然的に用いる有機溶媒量が増えることになる。

25 さらに、これらの方法では、界面活性剤や有機溶媒を、透析やゲルろ過などにより除去する作業が必要であり、効率的な製造方法とは言えない。

（2）有機溶媒を用いずに脂質を水和する方法として、加熱する方法、せん断力を加える方法、粉末化する方法などの物理的手段により脂質の水和を促

進させる方法が知られている。

しかし、脂質、薬物、水性分散媒またはその他の原料を脂質の相転移温度以上に加熱しながら攪拌する加温法（特公平４－３６７３５号明細書または特公平４－２８４１２号明細書参照）は、熱に弱い薬物を含む場合には適さ  
5 ず、脂質、薬物、水性分散媒またはその他の原料にせん断力を加えるメカノケミカル法は、脂溶性薬物の場合に回収率が定まりにくいという問題点がある。また、脂質とその他の原料を一旦溶解して粉末化する噴霧乾燥法（特公平４－３７７３１号明細書参照）では、脂質の非晶質化と表面積の増大により水和が速やかに行なわれるが、やはり熱や回収率に問題があること、装置  
10 が大掛かりであることなどから、工業化が容易な方法ではない。

このようにそれぞれの方法には種々の問題がある上、水和後のリポソームの粒子径の微小化も十分なものではなかった。

一方、リポソームを製造する際に、糖類や電解質などの水溶性の添加物がよく用いられる。

15 これらを添加する主な目的は、（１）注射剤として用いる際の等張化、（２）凍結乾燥時におけるリポソーム形態の保持、または（３）脂質薄膜形成時の芯物質とするためである。

例えば、特開平９－１１０８２８号（ＥＰ７５８６４５）明細書には、活性成分以外の助剤として、糖類（ラクトース、マンニトール等）の添加が可能である旨の記載があり、製造時に１０％マルトース溶液を用いている（実施例４）。

リポソームテクノロジー（Gregory Gregoriadis 編集、LIPOSOME TECHNOLOGY, Vol. I, 2nd Edition, 229-252（1993 年発行））には、凍結乾燥時におけるリポソーム形態の保持に与える、種々の糖の効果が検討されて  
25 いる。

また、特公平３－６２６９６号明細書には、糖類を賦形剤として用いて凍結乾燥することによりリポソーム製剤の特性が改善される旨の記載があり、製造時の糖類濃度は１～１０％とある。

特公平5-51338号(EP119020)明細書には、水可溶性粒状担体物質にリポソーム薄膜を被覆する方法が記載されており、その担体物質としてソルビトール、マンニトール、キシリトール、天然産出アミノ酸類、ラクトース、デキストロース、スクロースが挙げられている。また、約1~  
5 10%W/V、好ましくは約3~7%W/Vの濃度の等張水溶液を形成すべきであると記載されている。

このようにリポソームを製造する際に従来から糖類が添加されてはいるが、いずれも微小なりポソームを製造することを目的として添加されたものではなく、またその濃度も等張である10%程度でしか用いられておらず、本発  
10 明のように高濃度では用いられていない。

#### 発明の開示

本発明の課題は、有機溶媒を極力使用せず、また過酷な物理的処理手段を使用しないで、効率的に微小なりポソームを製造する方法、およびその製造  
15 方法によって得られる微小なりポソームを提供することにある。

本発明者らは、上記課題を解決するために、鋭意研究を重ねた結果、リポソーム製造工程において、従来技術では採用されていない高濃度の糖類を用いることによって微小なりポソームが容易かつ効率的に製造できることを見出し、本発明を完成した。

20 すなわち、本発明は以下の微小なりポソーム及びその製造方法を提供するものである。

[1] 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入することにより得られる微小なりポソーム。

[2] 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料  
25 を注入することにより得られる粒子径が400nmより小さい前項1に記載のリポソーム。

[3] 糖10質量部に対して水を1~30質量部の割合で含む糖水溶液もしくは糖スラリーを用いる前項1記載のリポソーム。

- [4] 糖 10 質量部に対して水を 2 ～ 15 質量部の割合で含む糖水溶液もしくは糖スラリーを用いる前項 3 記載のリポソーム。
- [5] 単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる前項 1 記載のリポソーム。
- 5 [6] グルコース、フルクトース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、キシリトール、マンニトールおよびエリスリトールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる前項 5 記載のリポソーム。
- [7] 糖 10 質量部に対して、脂質の割合が 5 質量部以下となる量の脂質を含むリポソーム原料を用いる前項 1 記載のリポソーム。
- 10 [8] 脂質を含むリポソーム原料として、脂質の水溶性有機溶媒溶液を用いる前項 1 記載のリポソーム。
- [9] 水溶性有機溶媒が、炭素数 4 までの低級アルコール、アセトンおよびアセトニトリルから選ばれる前項 8 記載のリポソーム。
- [10] 脂質 10 質量部に対して 1 ～ 100 質量部の水溶性有機溶媒を使用
- 15 する前項 8 記載のリポソーム。
- [11] 凍結乾燥リポソーム製剤としたときに、脂質 10 質量部に対して、0.5 ～ 50 質量部の水溶性有機溶媒が残存する前項 10 記載のリポソーム。
- [12] 凍結乾燥リポソーム製剤としたときに、脂質 10 質量部に対して、0.5 ～ 30 質量部の水溶性有機溶媒が残存する前項 11 記載のリポソーム。
- 20 [13] 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入し混合することを特徴とする微小なりポソームの製造方法。
- [14] 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入し混合して粒子径が 400 nm より小さいリポソームを得る前項 13 に記載のリポソームの製造方法。
- 25 [15] 糖 10 質量部に対して水を 1 ～ 30 質量部の比率で混合して得た糖水溶液もしくは糖スラリーを用いる前項 13 記載のリポソームの製造方法。
- [16] 糖 10 質量部に対して水を 2 ～ 15 質量部の比率で混合して得た糖水溶液もしくは糖スラリーを用いる前項 15 記載のリポソームの製造方法。

〔17〕単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる前項13記載のリポソームの製造方法。

〔18〕グルコース、フルクトース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース、キシリトール、マンニトールおよびエリトリトールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる前項17記載のリポソームの製造方法。

〔19〕糖10質量部に対して、脂質の割合が5質量部以下となる量の脂質を含むリポソーム原料を用いる前項13記載のリポソームの製造方法。

〔20〕脂質を含むリポソーム原料として、脂質の水溶性有機溶媒溶液を用いる前項13記載のリポソームの製造方法。

〔21〕水溶性有機溶媒が、炭素数4までの低級アルコール、アセトンおよびアセトニトリルから選ばれる前項20記載のリポソームの製造方法。

〔22〕脂質10質量部に対して、1～100質量部の水溶性有機溶媒を使用する前項20記載のリポソームの製造方法。

〔23〕凍結乾燥リポソーム製剤としたときに、脂質10質量部に対して、0.5～50質量部の水溶性有機溶媒が残存するリポソームを得る前項22記載のリポソームの製造方法。

〔24〕凍結乾燥リポソーム製剤としたときに、脂質10質量部に対して、0.5～30質量部の水溶性有機溶媒が残存するリポソームを得る前項23記載のリポソームの製造方法。

#### 発明の詳細な説明

本発明は、糖と水を加熱や攪拌によって混合した高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入し混合することにより得られる微小なりポソーム、及びその製造方法に関する。

本発明の方法によれば、有機溶媒の使用量を少量に抑えて、また過酷な物理的処理手段を採用せずに、容易かつ効率的に微小なりポソームを得ることができる。

本発明によりリボソームを製造する際には、糖類は高濃度で用いられる。  
具体的には、糖 10 質量部に対して、水 1 ~ 30 質量部の比率で混合された  
ものが用いられる。好ましくは糖 10 質量部に対して、水 2 ~ 15 質量部、  
さらに好ましくは糖 10 質量部に対して、水 3 ~ 10 質量部の比率で用いら  
5 れる。また、その糖類は溶液、またはスラリーの状態 で用いられる。

本発明で用いられる糖類としては、グルコース、フルクトース、ガラクト  
ース等の単糖類、マルトース、ラクトース、スクロース、トレハロース等の  
二糖類、もしくはキシリトール、マンニトール、エリスリトール等の糖アル  
コール類があり、いずれも好ましい。また、糖類は一種または二種以上の糖  
10 類を組み合わせ て用いてもよい。より好ましくは、グルコース、マルトース、  
ラクトース、スクロース、トレハロース、キシリトールまたはそれらを組み  
合わせた糖類が用いられる。特に好ましくは、マルトースが用いられる。

本発明においては、糖と脂質の比率は制限されない。好ましくは、糖 10  
質量部に対して、脂質を含むリボソーム原料中の脂質が 5 質量部以下となる  
15 比率で用いられる。より好ましくは、糖 10 質量部に対して、リボソーム原  
料中の脂質が 1 質量部以下、特に好ましくは 0.0001 ~ 0.5 質量部の比率とな  
る量のリボソーム原料が用いられる。

本発明に用いられる脂質としては、リン脂質や糖脂質が挙げられる。例え  
ば、卵黄レシチン、大豆レシチン、ホスファチジルコリン（ジミリストイル  
20 ホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジステアロ  
イルホスファチジルコリン等）、リゾホスファチジルコリン、ホスファチジ  
ルグリセロール（ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジパルミト  
イルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロ  
ール等）、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミン、スフ  
25 インゴミエリン、ジセチルホスフェート、ホスファチジン酸またはそれらの  
混合物が挙げられ、いずれも好ましい。より好ましくは、卵黄レシチン、ホ  
スファチジルコリン（ジミリストイルホスファチジルコリン、ジパルミト  
イルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン等）、ホス



ファチジルグリセロール（ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール、ジステアロイルホスファチジルグリセロール等）、またはそれらの混合物が挙げられる。

また、リポソーム原料として、上記した脂質以外に、膜安定化物質、例えば、コレステロール等を添加することができるし、酸化防止剤として、例えば、 $\alpha$ -トコフェロール等を添加することができる。

本発明に用いられる脂質は、溶液、好ましくは濃厚な溶液、あるいは脂質溶液から溶媒を留去して得られた脂質の薄膜や粉末の状態で添加される。脂質溶液の溶媒としては、水溶性の有機溶媒が用いられる。例えば、メタノール、エタノールなどの炭素数が4までの低級アルコール、アセトンまたはアセトニトリルがあり、いずれも好ましい。より好ましくは、エタノールが用いられる。

本発明の方法によると、有機溶媒の使用量を少量に抑えて、微小なりポソームを製造することができる。例えば、脂質10質量部に対して、1～100質量部の有機溶媒が用いられる。より好ましくは1～50質量部の比率で用いられる。

また、本発明のリポソームは凍結乾燥製剤にすることができる。その際、リポソーム製造時に用いた有機溶媒がいくらか残存する。しかし、本願発明では有機溶媒の使用量を少量に抑えて、微小なりポソームを製造できるので、残存する有機溶媒量も少量ですむことになる。例えば、脂質10質量部に対して1～100質量部の有機溶媒を用いたリポソームを凍結乾燥した場合に、残存する有機溶媒は0.5～50質量部、より好ましくは、0.5～30質量部程度の少量となる。

本発明において、リポソームに保持させる生理活性物質は特に制限されない。それらを保持させる方法としては、例えば、水溶性の生理活性物質は、前もって糖水溶液または糖スラリー中に添加され、そこに脂質を含むリポソーム原料が注入される。また疎水性の生理活性物質は、必要最小限の有機溶

媒で溶解され、脂質を含むリポソーム原料と混合して、糖水溶液または糖スラリー中に注入される。

高濃度の糖水溶液または糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入し混合する際、必要により攪拌することができる。攪拌には通常の攪拌のほか、ホモジナイザーなどの乳化・分散装置を用いた攪拌でもよい。もちろん  
5 乳化・分散を促す装置を用いて攪拌することにより粒子径は速やかに小さくできる。

本発明の方法で製造することにより、過酷な物理的処理を使用しないで微小なリポソームを得ることができる。例えば、粒子径（動的光散乱法等で測定される）が約400nm以下の微小なリポソームを得ることができ、300nm以下の粒子径のリポソームをも容易に得ることができる。また、得られた微小なリポソームは必要により希釈することができる。  
10

本発明により製造されるリポソームの粒子径は、実用上十分な程度に微小ではあるが、粒子径をさらに小さくしたり、粒子径分布をより均一にするために、さらに物理的処理、例えば、ポリカーボネートフィルターによるエクストルージョン、高圧乳化または超音波照射等の処理を行なってもよい。  
15

#### 産業上の利用の可能性

本発明で得られる生理活性物質を含有するリポソームは、非経口投与のための注射剤、例えば、リポソーム注射液、または用時溶剤に溶解または懸濁して用いる固形の注射剤に製剤化され使用される。この注射剤は、安定剤、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤等を含んでいてもよい。これらは最終工程において滅菌するか無菌操作法によって調製される。また無菌の固形剤、例えば、凍結乾燥品を製造し、その使用前に無菌化または無菌の  
20 注射用蒸留水または他の溶剤に溶解して使用することもできる。

非経口投与のためのその他の製剤としては、例えば、外用液剤、軟膏剤、塗布剤、吸入剤、スプレー剤、坐剤および腔内投与のためのペッサリー等に製剤化され使用される。

### 発明を実施するための最良の形態

以下に、実施例によって本発明を詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 5 実施例 1

マルトース（1 k g）に水（1 L）を加え、加熱溶解した。室温まで冷却した50%マルトース水溶液に、卵黄レシチン（0.5 g）、エタノール（1.0 g）と脂溶性薬物（PGE1・（ドデカノイルオキシ）エチルエステル；0.05 g）からなるレシチン溶液を注入した。溶液を毎分8,000回転で30分  
10 間攪拌して、本発明のリポソームを得た。このリポソームを水で全量10 Lまで希釈し、動的光散乱により平均粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は190 nmであった。

#### 実施例 2

15 マルトース（1 k g）に水（1 L）を加え、加熱溶解した。室温まで冷却した50%マルトース水溶液に、卵黄レシチン（5.0 g）、エタノール（8.0 g）と脂溶性薬物（PGE1・（ドデカノイルオキシ）エチルエステル；0.5 g）からなるレシチン溶液を注入した。溶液を毎分10,000回転で30分間攪拌して、本発明のリポソームを得た。このリポソームを水で全量10 Lま  
20 で希釈し、動的光散乱により平均粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は180 nmであった。

#### 実施例 3

マルトース（2.5 k g）に水（2.5 L）を加え、加熱溶解した。室温まで冷  
25 却した50%マルトース水溶液に、卵黄レシチン（12 g）、エタノール（20 g）と脂溶性薬物（PGE1・（ドデカノイルオキシ）エチルエステル；1 g）からなるレシチン溶液を注入した。溶液を毎分8,000回転で30分間攪拌して、本発明のリポソームを得た。このリポソームを水で全量25

Lまで希釈し、動的光散乱により平均粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は210nmであった。

#### 実施例4

- 5 マルトース（1kg）に水（0.3L）を加えたマルトーススラリーに、卵黄レシチン（5.0g）とエタノール（8.0g）からなるレシチン溶液を注入した。スラリーを毎分8,000回転で15分間攪拌して、本発明のリポソームを得た。このリポソームを水で全量10Lまで希釈し、動的光散乱により平均粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は200nmであった。

10

#### 実施例5

- マルトース（20g）に水（8ml）を加えたマルトーススラリーに、ジミリストイルホスファチジルコリン（0.1g）とエタノール（0.2g）からなる溶液を注入した。スラリーを毎分100回転で60分間攪拌して、本発明
- 15 のリポソームを得た。このリポソームを水で全量200mlまで希釈し、動的光散乱により平均粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は130nmであった。

#### 実施例6

- 20 マルトース（20g）に水（8ml）を加えたマルトーススラリーに、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジパルミトイルホスファチジルグリセロールおよびコレステロールからなる混合物（65：5：30）（0.2g）とエタノール（0.3g）からなる溶液を注入した。スラリーを毎分100回転で60分間攪拌して、本発明のリポソームを得た。このリポソームを水で全
- 25 量200mlまで希釈し、動的光散乱により平均粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は220nmであった。

#### 比較例

マルトース（１０ｇ）に水（９０ｍｌ）を加えた１０％マルトース水溶液に、卵黄レシチン（０．３ｇ）とエタノール（３．０ｇ）からなるレシチン溶液を注入した。溶液を毎分１００回転で６０分間攪拌してリポソームを得た。このリポソームを水で、全量１００ｍｌまで希釈した。動的光散乱により平均  
5 粒子径を見積もった結果、リポソームの粒子径は８００ｎｍであった。

#### 実施例 7

各種糖の５０％水溶液（２０ｍｌ）に、卵黄レシチン（０．６ｇ）とエタノール（０．８ｇ）からなるレシチン溶液を注入した。溶液を、毎分１００回転  
10 で２４時間攪拌して、本発明のリポソームを得た。このリポソームを水で全量１００ｍｌまで希釈した。希釈液の波長４００ｎｍにおける吸光度を測定し、濁度を算出した。その結果を表１に示す。

表 1

糖	濁 度
マルトース	1. 0 3
トレハロース	1. 1 0
ラクトース	0. 5 1
スクロース	0. 9 7
グルコース	0. 8 1
キシリトール	0. 9 1

- 濁度は、粒子径の指標として用いられる値であり、濁度が小さい値ほど、粒子径も小さいことを表わしている (Gregory Gregoriadis 編集、LIPOSOME TECHNOLOGY, Vol. I, 2nd Edition, 568-571 (1993 年発行))。
- 5

表 1 の結果を、マルトースを用いた実施例 1 での結果を併せて考えると、各糖についても、マルトースを用いたときの粒子径と同等またはそれ以下の粒子径のリポソームを得ることができたことがわかる。

## 請求の範囲

1. 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入することにより得られる微小なリポソーム。
- 5 2. 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原料を注入することにより得られる粒子径が400nmより小さい請求の範囲1に記載のリポソーム。
3. 糖10質量部に対して水を1～30質量部の割合で含む糖水溶液もしくは糖スラリーを用いる請求の範囲1に記載のリポソーム。
- 10 4. 糖10質量部に対して水を2～15質量部の割合で含む糖水溶液もしくは糖スラリーを用いる請求の範囲3に記載のリポソーム。
5. 単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる請求の範囲1に記載のリポソーム。
6. グルコース、フルクトース、ガラクトース、マルトース、ラクトース、  
15 スクロース、トレハロース、キシリトール、マンニトールおよびエリスリトールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる請求の範囲5に記載のリポソーム。
7. 糖10質量部に対して、脂質の割合が5質量部以下となる量の脂質を含むリポソーム原料を用いる請求の範囲1に記載のリポソーム。
- 20 8. 脂質を含むリポソーム原料として、脂質の水溶性有機溶媒溶液を用いる請求の範囲1に記載のリポソーム。
9. 水溶性有機溶媒が、炭素数4までの低級アルコール、アセトンおよびアセトニトリルから選ばれる請求の範囲8に記載のリポソーム。
10. 脂質10質量部に対して1～100質量部の水溶性有機溶媒を使用  
25 する請求の範囲8に記載のリポソーム。
11. 凍結乾燥リポソーム製剤としたときに、脂質10質量部に対して、0.5～50質量部の水溶性有機溶媒が残存する請求の範囲10に記載のリポソーム。

- 1 2. 凍結乾燥リポソーム製剤としたときに、脂質 10 質量部に対して、  
0.5～30 質量部の水溶性有機溶媒が残存する請求の範囲 11 記載のリポソ  
ーム。
- 1 3. 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原  
5 料を注入し混合することを特徴とする微小なりポソームの製造方法。
- 1 4. 高濃度の糖水溶液もしくは糖スラリーに、脂質を含むリポソーム原  
料を注入し混合して粒子径が 400 nm より小さいリポソームを得る請求の  
範囲 13 に記載の微小なりポソームの製造方法。
- 1 5. 糖 10 質量部に対して水を 1～30 質量部の比率で混合して得た糖  
10 水溶液もしくは糖スラリーを用いる請求の範囲 13 記載のリポソームの製造  
方法。
- 1 6. 糖 10 質量部に対して水を 2～15 質量部の比率で混合して得た糖  
水溶液もしくは糖スラリーを用いる請求の範囲 15 記載のリポソームの製造  
方法。
- 15 1 7. 単糖類、二糖類および糖アルコールから選ばれる一種または二種以  
上の糖を用いる請求の範囲 13 記載のリポソームの製造方法。
- 1 8. グルコース、フルクトース、ガラクトース、マルトース、ラクトー  
ス、スクロース、トレハロース、キシリトール、マンニトールおよびエリス  
リトールから選ばれる一種または二種以上の糖を用いる請求の範囲 17 記載  
20 のリポソームの製造方法。
- 1 9. 糖 10 質量部に対して、脂質の割合が 5 質量部以下となる量の脂質  
を含むリポソーム原料を用いる請求の範囲 13 記載のリポソームの製造方法。
- 2 0. 脂質を含むリポソーム原料として、脂質の水溶性有機溶媒溶液を用  
いる請求の範囲 13 記載のリポソームの製造方法。
- 25 2 1. 水溶性有機溶媒が、炭素数 4 までの低級アルコール、アセトンおよ  
びアセトニトリルから選ばれる請求の範囲 20 記載のリポソームの製造方法。
- 2 2. 脂質 10 質量部に対して 1～100 質量部の水溶性有機溶媒を使用  
する請求の範囲 20 記載のリポソームの製造方法。



23. 凍結乾燥リボソーム製剤としたときに、脂質10質量部に対して、  
0.5～50質量部の水溶性有機溶媒が残存するリボソームを得る請求の範囲  
22記載のリボソームの製造方法。

24. 凍結乾燥リボソーム製剤としたときに、脂質10質量部に対して、  
5 0.5～30質量部の水溶性有機溶媒が残存するリボソームを得る請求の範囲  
23記載のリボソームの製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/03472

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K9/127

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K9/127

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 6-239734, A (Kanebo, LTD.), 30 August, 1994 (30.08.94) (Family: none) (especially, Claims; Par. Nos. [0013], [0014], [0022], [0023])	1, 2, 5, 6, 8-10, 13, 14, 17, 18, 20-22 3, 4, 7, 11, 12, 15 , 16, 19, 23, 24
X A	JP, 60-7933, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 16 January, 1985 (16.01.85) (Family: none) (especially, examples 1, 3, 4, )	1, 5, 6, 13, 17, 18 2-4, 7-12, 14-16 , 19-24
X A	JP, 3-123637, A (Kao Corporation), 27 May, 1991 (27.05.91) (Family: none) (especially, Claims 1, 3; examples 1, 2, )	1, 2, 5, 6 3, 4, 7-24

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:  
 "A" document defining the general state of the art which is not  
 considered to be of particular relevance  
 "E" earlier document but published on or after the international filing  
 date  
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is  
 cited to establish the publication date of another citation or other  
 special reason (as specified)  
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other  
 means  
 "P" document published prior to the international filing date but later  
 than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or  
 priority date and not in conflict with the application but cited to  
 understand the principle or theory underlying the invention  
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered novel or cannot be considered to involve an inventive  
 step when the document is taken alone  
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be  
 considered to involve an inventive step when the document is  
 combined with one or more other such documents, such  
 combination being obvious to a person skilled in the art  
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
 28 July, 2000 (28.07.00)

Date of mailing of the international search report  
 08 August, 2000 (08.08.00)

Name and mailing address of the ISA/  
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A 61 K 9 / 1 2 7

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>1</sup> A 61 K 9 / 1 2 7

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	J P, 6-239734, A (鐘紡株式会社) 30. 8月. 1994 (30. 08. 94) (ファミリーなし) (特に、特許請求の範囲、[0013]、[0014]、[0022]、[0023])	1, 2, 5, 6, 8-1 0, 13, 14, 17, 1 8, 20-22 3, 4, 7, 11, 12, 15, 16, 19, 23, 24
X A	J P, 60-7933, A (第一製薬株式会社) 16. 1月. 1985 (16. 01. 85) (ファミリーなし) (特に、実施例1、3、4)	1, 5, 6, 13, 17, 18 2-4, 7-12, 14- 16, 19-24

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 07. 00

国際調査報告の発送日

08.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲 英 子

4C

8517

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 3-123637, A (花王株式会社) 27. 5月. 1991 (27. 05. 91) (ファミリーなし) (特に、特許請求の範囲1, 3、実施例1, 2)	1, 2, 5, 6
A		3, 4, 7-24